

раженной гетероспермии *P.major* тем не менее не может быть отнесен к гетеродиа-споричным видам. Подобное проявление гетероспермии характеризует самый низкий уровень адаптивной специализации гетерокарпного вида.

#### **Библиографический список**

1. Nicotra L. Eterocarpia ed eterospermia/ L.Nicotra // Bull.Soc.Bot.ital., 1898.- T.12.- P.213 – 216
2. Huth E. Ueber geocarpe, amphicarpe und heterocarpe Pflanzen/ E.Huth// Samml. Naturwis.- Votr., 1890.- Bd.3.- № 10. S.1 – 32
3. Delpino F. Eterocarpia ed eteromercarpia nelle Angiospermae/ F.Delpino// Mem. R. Accad. Sci. Istituto Bologna., 1894.- T.4.- Ser.5.- P.27 – 68
4. Войтенко В.Ф. Гетерокарпия (гетеродиаспория) у покрытосеменных растений: анализ понятия, классификация, терминология/ В.Ф.Войтенко// Ботанический журнал.- М., 1989.- Е.74.- №3.- С.281 – 297
5. Левина Р.Е., Войтенко В.Ф. Гетерокарпия или разноплодие/ Р.Е.Левина// Природа.- М., 1975.- №5.- С.87 – 95
6. Muller-Schneider P., Lhotska M. Zur Terminologie der Verarbeitungbiologie der Blütenpflanzen/ P. Muller-Schneider// Folia Geobot et Phytotaxon., 1971.- Vol.6.- № 4.- P. 407 – 417
7. Меликян А.П. Некоторые современные аспекты исследования семян цветковых растений/ А.П.Меликян// Теоретическая и прикладная карпология. Кишинев, 1989. С.24 - 27

УДК 633.256

### **ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭТАНОЛА В ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ ВИНАХ И СОКАХ**

**Владимир Андреевич Сибирный**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

*e-mail: vladimir\_sibirnyi@yahoo.com*

**Гончар Михаил Васильевич**, доктор биологических наук, профессор, Институт биологии клетки НАН Украины, 79005, Львов, ул. Драгоманова, 14/16 Телефон: (0322) 72-8508; *e-mail: myg52@yahoo.com*

**Ключевые слова:** алкоголь, ферментативное определение, алкогольоксидаза, плодово-ягодные вина, соки

Работа посвящена использованию ферментного набора «Алкотест» для определения содержания этанола в плодово-ягодных винах и соках. Такой метод значительно дешевле по сравнению с другими ферментативными методами благодаря низкой стоимости препарата алкогольоксидазы (АО), полученной из мутантного штамма метилотрофных дрожжей *Hansenulapolyomorpha*C-105 (*gcr1 catX*) с нарушенной катаболитной репрессией синтеза АО. Компоненты исследованных напитков не оказывают негативного влияния на результаты определения, что подтверждено методом газовой хроматографии.

#### **Введение**

Тесты на наличие этанола и определе-

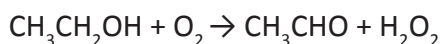
ние его содержания играют важную роль в контроле процессов брожения и сертифи-

кации различных алкогольных и безалкогольных напитков. Имеется ряд различных химических и физико-химических методов для определения спиртов [1]. Простейший тест заключается в перегонке спирта и денсиметрическом или рефрактометрическим анализом дистиллята. Недостатки таких методов – их продолжительность, низкая точность и сложность выполнения серийных определений.

Особенно эффективна газо-жидкостная хроматография, которая обеспечивает возможность одновременной идентификации и количественного определения различных веществ [2], однако из-за высокой стоимости оборудования и необходимости квалифицированного персонала этот метод не получил широкого распространения. Аналогичные ограничения имеют экспресс-методы определения этанола с использованием ядерно-магнитного резонанса (ЯМР).

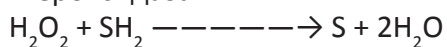
Для определения этанола давно предложен ферментативный метод, с использованием фермента алкогольдегидрогеназы (АДГ) в присутствии кофермента (НАД). Этот метод достаточно чувствителен и селективен, но из-за высокой стоимости фермента и кофактора слишком дорог. Альтернативой может быть фермент алкогольоксидаза (АО) метилотрофных дрожжей. В отличие от АДГ АО содержит крепко связанный коэнзим ФАД (флавинадениндинуклеотид) и не требует добавления экзогенного кофактора и, кроме того, оксидазная реакция необратима [3]. Фермент АО катализирует окисление этанола кислородом воздуха с образованием уксусного альдегида и перекиси водорода:

АО



Перекись водорода окисляет в пероксидазной реакции специфичное химическое соединение (хромоген) до окрашенного продукта, количество которого можно определять фотометрически:

Пероксидаза



Хромоген Краситель

На этой реакции основано использование АО в аналитическом наборе «Алкотест»,

разработанный в Институте биологии клетки НАН Украины [4]. Этот вариант анализа имеет ряд преимуществ: 7-кратное увеличение чувствительности, точность определения [5] и снижение его стоимости в связи с дешевой полученного препарата АО из мутанта *H. polymorpha*C-105 (*gcr1 catX*), способного к синтезу фермента на минеральной среде с глюкозой.

Целью работы было использование ферментного набора «Алкотест» для определения содержания этанола в плодово-ягодных винах и соках.

**Материалы и методы.** В исследованиях использовали фруктовые напитки и соки различных фирм, плодово-ягодные вина «Особое», «Цезарь», «Канелли», «Вальдвейн», «Бабушкина наливка», а также виноподобные напитки «Клубничная бочка», «Медовая липа», «Медовуха» и безалкогольное пиво TESCO.

Определение этанола в пробах проводили с использованием аналитического набора «Алкотест» по методике [3]. В набор входят: *Хромоген* (сухая смесь 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ)); *Ферменты* (суспензия АО и пероксидазы хрена (ПО) в сульфате аммония); *Стандарт* (образцовый раствор этанола концентрацией 10 г/л); 0,8 МНСI – реактив для остановки реакции.

Для получения АО – компонента набора «Алкотест» использовали безкатализный мутантный штамм метилотрофных дрожжей с нарушенной глюкозной катаболитной репрессией *H. polymorpha*C-105 (*gcr1 catX*).

Разведения анализированных проб вин (250×, 500×, 750×, 1000×, 1250× или 1500×) выполняли в зависимости от содержания этанола. Реакцию проводили во временном режиме. К 100 мкл каждого разведения пробы добавляли 3,5 мл смеси хромогена с ферментами с интервалом 15 сек. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,8 МНСI в той же последовательности и временном интервале. В каждой серии выполняли также «слепые» пробы (добавление воды вместо пробы исследуемого материала) и образцовые пробы (добавление стандартного раствора этанола вместо исследуемого материала). Оптическую плот-

ность определяли при длине волны 450 нм против «слепой» пробы.

Кроме обычного определения содержания этанола в пробах методом АОП с использованием набора «Алкотест» применяли также ее модификацию «Метод стандартных добавок» (МСД). Методика эта заключалась в добавлении к определенной аликвоте (100 мкл) исследуемого вина в разведении 500× различных количеств стандарта этанола (для внутренней калибровки на фоне исследуемой пробы) и последующим определении этанола.

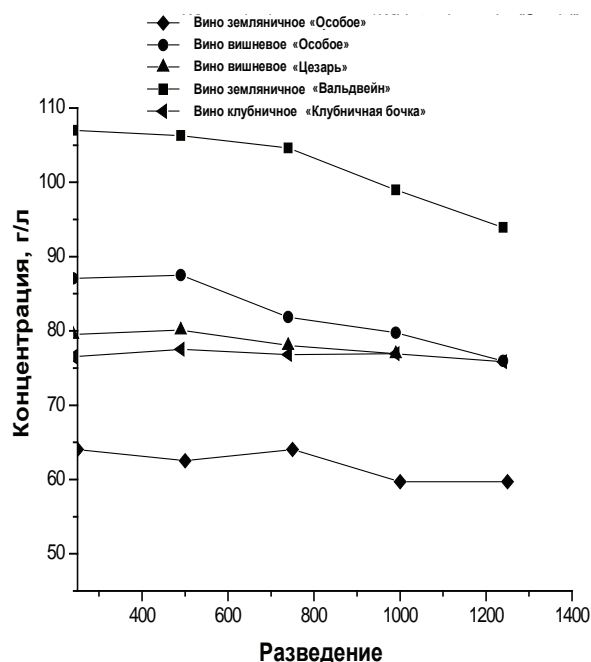
Для сравнения результатов, полученных по методу АОП в модификации МСД, использовали методику газовой хроматографии (ГХ): хроматограф LCM-80, колонка 200×0,3 см, детектор – катарометр. К пенициллиновому флакону с 0,5 мл 50 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ) добавляли 0,5 мл исследуемой пробы, флакон закрывали и встряхивали. Затем шприцом добавляли 0,3 мл 30 % нитрита натрия и после перемешивания 2 мл газовой фазы вводили в хроматограф. В качестве внутреннего стандарта использовали пропанол. 2 мл 4 ‰ (г/л) пропанола смешивали с 2 мл исследуемой пробы и 1 мл смеси добавляли во флакон с 0,5 мл 50 % ТХУ, закрывали и шприцом добавляли 0,3 мл 30 %  $\text{NaNO}_2$ . После 1 мин перемешивания 2 мл газовой фазы вводили в хроматограф. Для калибровочной кривой использовали 1, 2, 3, 4 и 6 ‰ водный раствор этанола, концентрацию которого определяли по высоте пиков азотистого этила.

**Результаты и обсуждение.** Использование метода АОП для анализа содержания этанола не требует дистилляции алкоголя, которая могла бы элиминировать компоненты вина или сока, отрицательно влияющие на ход ферментативной реакции. К таким компонентам вина принадлежат, например, фенолы, нарушающие действие ферментов, восстанавливающие вещества, а также пигменты, наличие которых может приводить к неправильным результатам.

Красные виноградные вина содержат высокие концентрации фенолов, которые могут окисляться перекисью водорода, возникающей в реакции АО с этанолом в присут-

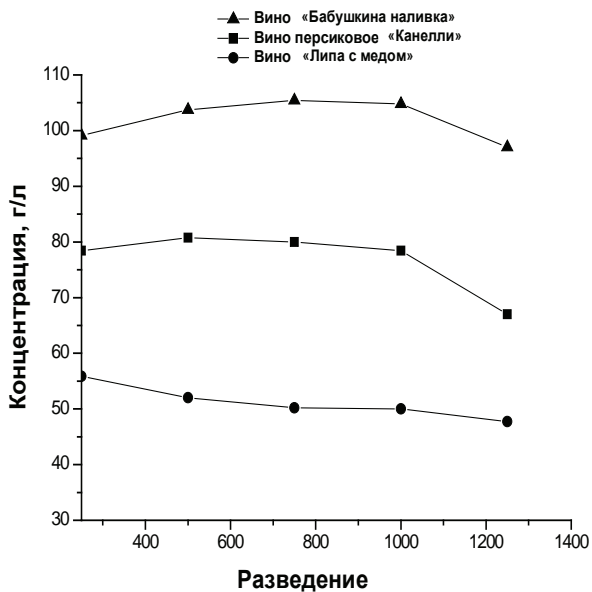
ствии пероксидазы. В этом случае реакция окисления хромогена ТМБ пероксидазой может конкурировать с реакцией окисления фенолов вина и приводить к ошибочным выводам. Для подтверждения возможного отрицательного влияния специфического химического состава различных напитков на результаты определения этанола, были проведены специальные исследования.

Проведено определение содержания алкоголя в изучаемых винах со стандартным использованием аналитического ферментативного набора «Алкотест». Как видно из данных, представленных на рис. 1 и 2, не выявлено существенного отрицательного влияния химического состава вина на рассчитанное содержание алкоголя, так как в случае меньшего разведения, когда можно было ожидать наибольшего отрицательного влияния компонентов напитков на ход ферментативного определения, эти концентрации почти не уменьшаются. Наоборот, наблюдается уменьшение рассчитанного количества этанола по мере разведения.

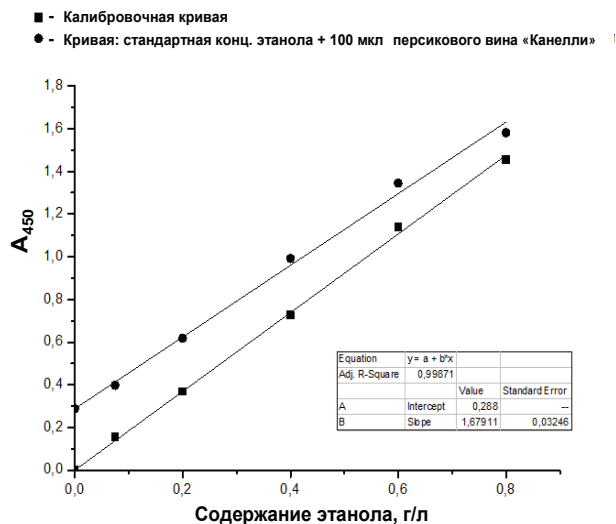


**Рис. 1. Определяемая концентрация этанола в красных плодово-ягодных винах в зависимости от разведения проб.**

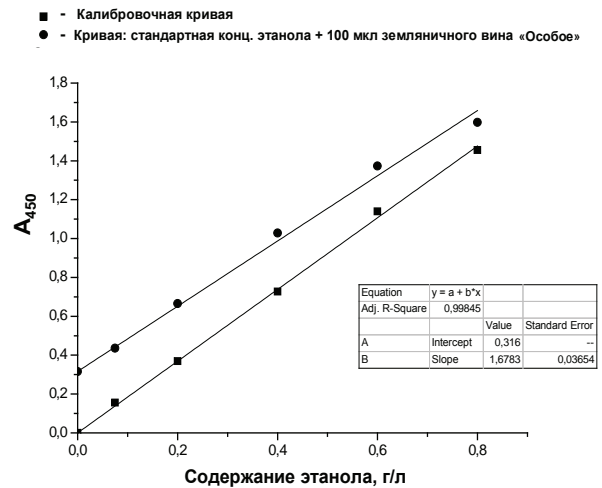
В дальнейшем проведено сравнение результатов определения содержания алкоголя в красных и белых плодово-ягодных ви-



**Рис. 2. Определяемая концентрация этанола в белых плодово-ягодных винах в зависимости от разведения проб.**



**Рис. 3. Определение этанола в белом персиковом вине «Канелли» методом МСД**



**Рис. 4. Определение этанола в красном земляничном вине «Особое» методом МСД**

нах, полученные при помощи классической методики АОП и ее модификации МСД (рис. 3, 4)

Линейность для двух использованных методик была весьма высока (коэффициенты линейной регрессии составляли, соответственно, 0,9976 при  $p < 0,0001$  для красных и 0,9974 при  $p < 0,0001$  для белых плодово-ягодных вин).

Калибровочные кривые для классической методики и ее модификации МСД имели подобные значения наклона: 1,679 и 1,845 – для плодово-ягодных красных вин и 1,678 и 1,845 – для белых вин.

Различия в калибровочных коэффициентах для классической методики и методики МСД не превышали 9,0 %. Концентрации этанола, полученные в случае применения обеих методик подобны (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что наличие ингибирующих веществ в плодово-ягодных красных и белых винах оказывают незначительное действие на ход реакции окисления ТМБ пероксидазой.

**Таблица 1**

**Определение этанола в плодово - ягодных винах различными методами: стандартным АОП, МСД, ГХ**

Вино	Метод	Содержание этанола, %			Разница, %	
		АОП	МСД	ГХ	АОП- ГХ	МСД-ГХ
Вино персиковое „Канелли“		9,80	8,63	9,02	+8,0	-4,5
Вино земляничное „Особое“		9,22	9,94	8,52	+7,6	+14,0

В дальнейшем был проведен анализ содержания алкоголя в изучаемых пробах при помощи ГХ, которая показала незначительные различия данных о концентрации этанола. Содержание этанола, определенное техникой ГХ, в пробах красного и белого вина составляло, соответственно, 8,52 % и 9,02 %, тогда как в модификации МСД для красного вина составляло 9,94 %, а для белого 8,63%. В табл. 1 сопоставлены все методы, которые применялись для определения концентрации алкоголя в красных и белых плодово-ягодных винах. Сравнение различных результатов, полученных классической методикой АОП и ее модификацией МСД по отношению к ГХ показало, что МСД не характеризуется лучшей корреляцией результатов по сравнению с классической АОП. В связи с изложенным, можно утверждать, что для серийных определений алкоголя в плодово-ягодных винах (белых и красных) оправданно использование менее трудоемкого классического варианта анализа, который не требует внутренней калибровки.

Для определения содержания алкоголя в соках и безалкогольных напитках с целью увеличения чувствительности метода проводили анализ с 5-кратно увеличенным содержанием ферментов. При использовании классического варианта метода АОП, линейность калибровочной кривой сохранялась до концентрации аналита 0,9 г/л (рис. 5). При 5-кратном увеличении содержания ферментов (АО и ПО) в реакционной смеси отмечалось также 5-кратное увеличение наклона калибровочной кривой (8,02 по

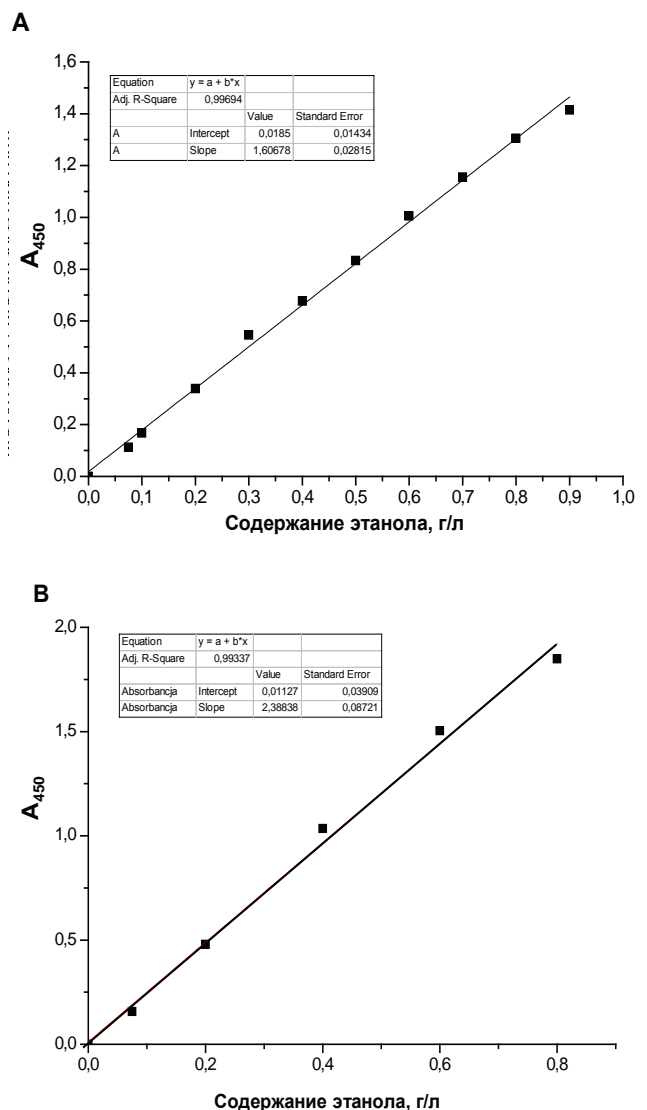


Рис. 5. Калибровочная кривая для определения этанола методом АОП. А – стандартные условия; В – вариант с использованием 5-кратной концентрации ферментов.

Таблица 2

Содержание этанола в соках и безалкогольных напитках, определенное стандартным методом АОП и с использованием 5-кратной концентрации энзимов

Содержание этанола (%)	Соки и безалкогольные напитки			
	Клубничный напиток „Каппи“	Яблочный сок „Фортуна“	Малиновый сок „Карми“	Пиво безалкогольное „TESCO“
Стандартный метод АОП	0,035	0,024	0,009	0,005
5-кратная концентрация энзимов	0,068	0,043	0,022	0,049

сравнению с 1,61). При использовании такого варианта метода в исследуемых соках и безалкогольных напитках обнаруживались следовые количества алкоголя, что невозможно при использовании стандартной методики. Таким образом, этот вариант метода несмотря на использование большего количества ферментов является в 5 раз более чувствительным (табл.2).

Преимуществами ферментативного метода АОП с использованием набора «Алкотест» являются хорошие аналитические свойства, высокая стабильность и воспроизведение результатов, что позволяет использовать этот набор для контроля содержания алкоголя в плодово-ягодных красных и белых винах, а также, в соках и безалкогольных напитках.

#### **Заключение**

Проведенные исследования показали, что ферментативный метод АОП с использованием набора «Алкотест» позволяет с высокой точностью определять содержание этанола в красных и белых плодово-ягодных винах, соках и безалкогольных напитках. Методу свойственна высокая чувствительность и хорошая линейность в широком диапазоне концентраций аналита. Применение метода значительно облегчает определение содержания этанола, а анализ требует меньших затрат времени и труда. Использованный метод значительно дешевле по сравнению с другими ферментативными методами благодаря низкой стоимости препарата АО, полученной из мутантного штамма метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) с нарушенной катаболитной репрессией синтеза АО и блоком каталазы.

Сравнение классической методики АОП и ее модификации МСД показало отсутствие существенного влияния ингибирующих компонентов, наличие которых могло

отрицательно сказываться на результатах определения этанола. Сравнение методики МСД с методом ГХ показало незначительные отличия в содержании этанола в исследуемых продуктах. 5-кратное увеличение содержания ферментов по сравнению с классической АОП-методикой позволяет обнаруживать следовые количества этанола в фруктово-ягодных соках, напитках и безалкогольном пиве.

Представленные результаты свидетельствуют о возможности использования метода АОП для анализа этанола в алкогольных и безалкогольных напитках, соках и вине. Использование этого метода облегчает анализ этанола по сравнению с традиционными методами -рефрактометрическим и ареометрическим.

#### **Библиографический список**

1. Методы технокимического и микробиологического контроля в виноделии // Под ред. Г.Г. Валуйко. М: Пищевая промышленность, 1980. - 145 с.
2. Jain N.C., Cravey R.H. Analysis of alcohol. II. A review of gas chromatographic methods // J. Chromatogr. Sci. – 1972. – V. 10. – P. 263-267.
3. Gonchar M., Maidan M., Pavlishko H., Sibirny A. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages // Food Technol. Biotechnol. – 2001. – V. 39. – P. 37-42.
4. Гончар М.В., Майдан М.М., Сибирний А.А. Способ кількісного визначення перекису водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах // Патент України 10752. – 1996. – Бюлл. № 4.
5. Гончар М.В., Сибирний А.А. Способ определения пероксидазной активности биологических объектов // Авторское свидетельство СССР 1636773. Бюлл. Изобретений - 1991. - Т. 11.